

SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR *Bacillus spp.* ISOLADOS DE FRUTAS

VINICYUS FORTES DE OLIVEIRA*
LUANA ROCHA FLEMING**
PATRÍCIA SILVIA FERREIRA***
JANAÍNA DOS SANTOS NASCIMENTO****

O objetivo deste trabalho consistiu na investigação da produção de substâncias antimicrobianas por estirpes de *Bacillus*, isoladas de frutas, e verificar o potencial dessas substâncias na inibição de patógenos, associados à deterioração ou à transmissão de doenças por alimentos, como fungos e bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas. Dez estirpes submetidas à coloração de Gram que mostraram ser bacilos foram testadas quanto à produção de substâncias antimicrobianas, utilizando-se como indicadores diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Três estirpes, denominadas de Ame3, Mam1 e Pes1 apresentaram os maiores espectros de ação contra bactérias Gram-positivas, sugerindo que as substâncias produzidas por essas estirpes possam apresentar potencial de aplicação como biopreservativo de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Bacillus sp.; BIOPRESERVATIVO DE ALIMENTOS; ANTIMICROBIANOS.

- * Técnico em Alimentos pelo Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), Graduando em Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ (e-mail: vinicyusfortes@hotmail.com).
** Técnica em Biotecnologia pelo IFRJ, Graduanda em Medicina, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ (e-mail:lfleming@hotmail.com).
*** Doutora em Microbiologia, Professora, IFRJ, Rio de Janeiro, RJ (e-mail: patricia.ferreira@ifrj.edu.br).
**** Doutora em Microbiologia, Professora, IFRJ, Rio de Janeiro, RJ (e-mail: janaina.nascimento@ifrj.edu.br).

1 INTRODUÇÃO

Bactérias e fungos fazem parte da microbiota dominante de frutas e vegetais em geral (BEUCHAT, 1996), sendo que a maior parte dos contaminantes das frutas reside em sua parte externa. Seu interior permanece praticamente estéril a não ser que haja alguma ruptura de continuidade por lesões em alguma parte da casca (SANTOS, COELHO e CARREIRO, 2008). Esses microorganismos podem estar associados tanto à deterioração quanto à transmissão de doenças de origem alimentar, ocasionando perda econômica e problemas de saúde pública, respectivamente. O Brasil, por exemplo, é o maior produtor mundial de frutas *in natura*. No entanto, esses produtos são altamente perecíveis e sofrem deterioração em poucos dias, o que dificulta a sua comercialização, especialmente para longas distâncias (BRUNINI, DURIGAN e OLIVEIRA, 2002; SANTOS, COELHO e CARREIRO, 2008).

Algumas bactérias patogênicas como, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* são de grande importância para a saúde pública e estão relacionadas com surtos de infecção alimentar em razão do consumo de frutas e hortaliças frescas contaminadas (BEUCHAT, 2002). Já os fungos assumem importância não somente sob o ponto de vista sensorial, devido à deterioração dos alimentos, mas também pelo perigo que a produção de micotoxinas representa para o consumidor (PEREIRA, CARVALHO e PRADO, 2002).

Tem sido observado aumento nos esforços para a pesquisa de novas substâncias que possam atuar não somente no tratamento, mas no controle e prevenção de doenças veiculadas por alimentos como frutas e hortaliças.

Os compostos biologicamente ativos produzidos por estirpes de *Bacillus* incluem alguns bem conhecidos como os antibióticos. Também se pode citar a butirósina, que é um aminoglicosídeo (SLEPECKY e HEMPHILL, 2006) e outra classe de substâncias: as bacteriocinas (SCHMITTER *et al.*, 2007). Bacteriocinas constituem grupo de peptídios sintetizados via ribossomos e são, em geral, peptídios catiônicos de natureza hidrofóbica, cujo modo de ação principal está na formação de poros na membrana plasmática da célula alvo (McAULIFFE, ROSS e HILL, 2001; RISØEN *et al.*, 2004).

Para a indústria de alimentos, a vantagem das bacteriocinas sobre os antibióticos reside no fato dessas serem degradadas por enzimas proteolíticas do sistema digestivo humano. Assim, podem ter aplicação na prevenção e controle de patógenos em alimentos, uma vez que antibióticos não podem ser utilizados em produtos alimentícios.

Algumas bacteriocinas produzidas por *Bacillus* sp são conhecidas como, por exemplo, a tochicina e as thuricinas 7 e 439, produzidas por *B. thuringiensis* (AHERN, VERSCHUEREN e VAN SINDEREN, 2003) e as cereínas de *B. cereus* (OSCÁRIZ, LASA e PISABARRO, 1999; BIZANI e BRANDELLI 2002). Essas bacteriocinas apresentam amplo espectro de ação contra diferentes bactérias Gram-positivas (RISØEN *et al.*, 2004; OSCÁRIZ *et al.*, 2005).

O objetivo deste trabalho consistiu na investigação da produção de substâncias antimicrobianas por estirpes de *Bacillus*, isoladas de frutas, e verificar o potencial dessas substâncias na inibição de patógenos, associados à deterioração ou à transmissão de doenças por alimentos, como fungos e bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de frutas (ameixa, banana, maçã, mamão e pêssego) foram adquiridas em mercados e feiras distribuídos em diferentes locais da cidade do Rio de Janeiro, sendo conduzidas imediatamente ao laboratório na embalagem fornecida pelo estabelecimento comercial.

2.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS*

As frutas foram maceradas, assepticamente, e 10 g de cada amostra pré-enriquecidos em 90 mL de água peptonada 1% por 24 horas. Em seguida, a preparação foi aquecida a 80°C por 15 min, de modo a eliminar as bactérias não esporuladas. Alíquotas foram inoculadas através de "spread plate" em placas contendo ágar nutriente e incubadas à temperatura ambiente por 24 a

48 horas. As colônias suspeitas de *Bacillus* sp foram submetidas a coloração de Gram e de esporos. Os bacilos Gram-positivos esporulados foram repicados para ágar nutriente e identificados por meio de testes bioquímicos, conforme descrito por Clauss e Berkeley (1986).

2.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS INIBITÓRIAS POR ESTIRPES DE *Bacillus*

Adotou-se o método descrito por Giambiagi-Demarval *et al.* (1990) e NASCIMENTO (2004), com algumas modificações. As estirpes se desenvolveram em placas contendo ágar tripticaseína de soja (TSA) a 37°C por 18h. Após a incubação, as culturas foram inoculadas sob a forma de pontos na superfície de placas contendo ágar TSA. Depois de 18h a 37°C, as bactérias foram mortas por exposição a vapores de clorofórmio por 30 min. Após sua evaporação, foram vertidos 3 mL de meio TSA semi-sólido acrescido de alíquotas de 0,3 mL da estirpe indicadora *Micrococcus luteus* (previamente crescida por 18h a 37°C, em 3 mL de caldo tripticaseína de soja - TSB). As placas foram reincubadas a 37°C por 18h, sendo a produção de substância inibitória indicada pelas zonas de inibição ao redor dos pontos de crescimento das estirpes produtoras.

2.4 AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE AÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS INIBITÓRIAS

O espectro de ação foi determinado conforme descrito no item anterior, utilizando-se diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os fungos filamentosos foram inoculados em placas de ágar TSA, juntamente com a estirpe produtora, verificando-se a inibição do crescimento fúngico (MACHADO *et al.*, 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dez estirpes de bacilos Gram-positivos, isoladas de amostras de frutas, foram selecionadas para os estudos subseqüentes (Tabela 1).

TABELA 1 - ESTIRPES DE *Bacillus* sp ISOLADAS DE FRUTAS

Estirpes	Origem
Ame1	ameixa
Ame3	ameixa
Ba4	banana
3Ba1	banana
3Ba2	banana
3Ba5	banana
Ma11	maçã
Mam1	mamão
Mam2	mamão
Pes1	pêssego

Todas as estirpes foram submetidas aos testes de produção de substâncias antagônicas, utilizando-se como indicadores diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Das dez estirpes isoladas, oito (80%) evidenciaram produção de algum tipo de substância antimicrobiana (Tabela 2). Nenhuma bactéria Gram-negativa testada foi inibida, entretanto, várias estirpes de *Bacillus* e *Staphylococcus* mostraram-se sensíveis às substâncias produzidas pela maior parte das estirpes. A Figura 1 mostra exemplo da inibição observada. As três estirpes de *Bacillus* que apresentaram

o melhor espectro de ação foram identificadas como *Bacillus pasteurii* (Pes1) e *Bacillus insolitus* (Mam2 e Ame3).

TABELA 2 - INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS PELAS ESTIRPES DE *Bacillus* sp ISOLADAS NESTE TRABALHO

Indicadoras	Produtoras							
	Ame1	3Ba2	3Ba1	Ame3	Mam1	Mam2	Pes1	3Ba5
Ame1	-	-	-	-	-	-	+	-
Ame3	-	-	-	-	-	-	+	-
3Ba1	-	-	-	+	-	-	+	+
3Ba5	-	-	-	-	-	-	+	-
Mam2	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i> LMIFRJ	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Bacillus circulans</i> LMIFRJ	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> LMIFRJ	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NCTC 10339	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> LMIFRJ	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Micrococcus luteus</i> LMIFRJ	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	-	-	-	+	-	+	+	-

+, inibição; -, ausência de inibição; LMIFRJ, Laboratório de Microbiologia do IFRJ. Apenas as estirpes que foram inibidas por pelo menos uma produtora estão apresentadas nessa tabela. As estirpes Gram-positivas *Staphylococcus aureus* 33591, *Staphylococcus aureus* 29213, *Bacillus thuringiensis* ATCC 33679 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, assim como as Gram-negativas *Acinetobacter bawarii* ATCC 19604, *Escherichia coli* ATC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas fluorescens* ATCC13525, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi ATCC 19214 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 não foram inibidas por nenhuma das produtoras testadas.

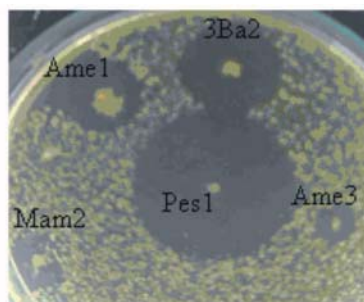


FIGURA 1 - TESTE DE PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS, SENDO *M. luteus*, A ESTIRPE INDICADORA

A contribuição mais conhecida do gênero *Bacillus* para a indústria de alimentos reside na produção de grande variedade de enzimas, tais como fitase, xilanase, ciclodextrinase, queratinase e amilase (SCHULZ, BONELLI e BATISTA, 2005). Entretanto, como verificado neste trabalho, esse gênero pode produzir substâncias antimicrobianas que são ativas contra microorganismos envolvidos em deterioração e toxinfecções alimentares, como é o caso de *Bacillus cereus*, patógeno clássico associado à síndrome diarréica ou emética (JAY, 2000).

Uma vez que a estirpe Pes1 apresentou o melhor espectro de ação assim como os maiores halos de inibição, a mesma foi escolhida para o teste de atividade contra fungos filamentosos e mostrou-se capaz de inibir *Aspergillus niger* (Figura 2) e *Aspergillus flavus*.



FIGURA 2 - TESTE DE PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTAGÔNICAS, SENDO *A. niger* A ESTIRPE INDICADORA E PES1 A ESTIRPE PRODUTORA

Nota: Mesmo após duas semanas de incubação, o fungo não foi capaz de crescer ao redor da estirpe produtora.

4 CONCLUSÃO

Três das estirpes isoladas de frutas, Pes1, Ame3 e Mam2 apresentaram maior potencial para inibição de bactérias Gram-positivas, sugerindo que as substâncias produzidas por essas estirpes possam apresentar aplicação e constituir nova alternativa para indústria na área de conservação de alimentos, seja como agentes antibacterianos, ou como agentes antifúngicos.

Novos testes serão realizados com maior número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como de fungos filamentosos. A natureza bioquímica das substâncias detectadas neste trabalho também está sendo estudada, visando determinar se as mesmas são proteicas, sugerindo então que possam ser bacteriocinas.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL SUBSTANCES PRODUCED BY *Bacillus spp.* ISOLATED FROM FRUITS

The present work aimed to investigate the production of a new antimicrobial substances by *Bacillus sp.* isolated from fruit, and verify its potential as a pathogen inhibitor associated to deterioration and food disease transmission, such as fungus and Gram-positive and Gram-negative bacteria. Ten strains were submitted to Gram stain and showed to be bacilli. These strains were tested for production of antimicrobial substances, using as indicators different Gram-positive bacteria. Three strains, named Ame3, Mam1 and Pes1 presented the largest spectrum of action against Gram-positive bacteria, suggesting that the substances produced by these strains may have some potential application as food biopreservative.

KEY-WORDS: *Bacillus sp.*; **FOOD BIOPRESERVATIVE; ANTIMICROBIAL SUBSTANCES.**

REFERÊNCIAS

- 1 AHERN, M.; VERSCHUEREN, S.; VAN SINDEREN, D. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p.127–131, 2003.
- 2 BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated to fresh product. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 204-216, 1996.
- 3 BEUCHAT, L. R. Ecological factor influencing survival and growth of humans pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infections**, v. 4, p. 413-423, 2002.

- 4 BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 512-519, 2002.
- 5 BRUNINI, M. A.; DURIGAN, J. F.; OLIVEIRA, A. L. Avaliação das alterações em polpa de manga "Tommy-Atkins" congeladas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 651-653, 2002.
- 6 CLAUSS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: BERGEY'S manual of determinative bacteriology. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1986. p. 1105-1141.
- 7 GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; MAFRA, M. A.; PENIDO, E. G. C.; BASTOS, M. C. F. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.1591-1599, 1990.
- 8 JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6th ed. London: Aspen Publ., 2000. 620 p.
- 9 MACHADO, A. P.; VIVI, V. K.; TAVARES, J. R.; GUEIROS FILHO, F. J.; FISCHMAN, O. Antibiosis and dark-pigments secretion by the phytopathogenic and environmental fungal species after interaction *in vitro* with a *Bacillus subtilis* isolate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 997-1004, 2010.
- 10 McAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 285-308, 2001.
- 11 NASCIMENTO, J. S. **Produção de bacteriocinas por estirpes de *Staphylococcus coagulase-negativos* associados à mastite bovina e estudo do papel da *orf12*, *orf13* e *orf14* na expressão da aureocina A53**. 2004. 198 p. Tese (Doutorado em Microbiologia), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- 12 OSCÁRIZ, J. C.; LASA, I.; PISABARRO, A. G. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, p. 337-341, 1999.
- 13 OSCÁRIZ, J. C.; CINTAS, L.; HOLO, H.; ÍLASA, I.; NES, I. F.; PISABARRO, A. G. Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 108-115, 2005.
- 14 PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 141-156, jan./jun. 2002.
- 15 RISØEN, P. A.; RØNNING, P.; HEGNA, I. K.; KOLSTØ, A. B. Characterization of a broad range antimicrobial substance from *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 648-655, 2004.
- 16 SANTOS, C. A. A.; COELHO, A. F. S.; CARREIRO, S. C. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 913-915, 2008.
- 17 SCHMITTER, J.M.; BRESSOLLIER, P.; VERNEUIL, B.; CHOBELET, A.; BALLADE, A.; URDACI, M. Search for new antibiotics produced by *Bacillus* strains. In: ASMS CONFERENCE, 55., 2007. **Proceedings** ... Santa Fé: American Society for Mass Spectrometry, 2007. Supplement 5.
- 18 SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus spp.* para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição (Araraquara)**, v. 16, n. 4, p. 403-411, 2005.
- 19 SLEPECKY, R. A.; HEMPHILL, H. E. The Genus *Bacillus* - nonmedical. In: THE PROKARYOTES. 3rd ed. New York: Springer, 2006. v. 4, p. 530-562.